ICS 67.050
CCS X 04

T/JAASS

团 体 标 准

T/JAASS XX—2022

畜禽产品致病菌梯型熔解温度等温扩增技术规范

Technical specification for ladder-shape melting temperature isothermal amplification of pathogenic bacteria in livestock and poultry products

（征求意见稿）

2022－XX －XX 发布 2022－XX－XX 实施

江苏省农学会 发 布

目　　次

前言 II
1 范围 1
2 规范性引用文件 1
3 术语和定义 1
4 生物安全措施 1
5 原理 1
6 试剂和材料 1
7 主要仪器和设备 2
8 检测程序 2

前　　言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则　第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由江苏省农学会提出并归口。

本文件起草单位：江苏省农业科学院、许昌学院。

本文件主要起草人：张 辉、王德国、包红朵、周 艳、张永清、孙军涛。

畜禽产品致病菌梯型熔解温度等温扩增技术规

1 范围

本标准规定了畜禽产品致病菌单核细胞增生李斯特菌、沙门氏菌和产气荚膜梭菌DNA的提取、梯型熔解温度等温扩增、检测及结果判定方法和操作规范。

本标准适用于畜禽产品致病菌的核酸定量检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 4789.30 食品安全国家标准 食品微生物检验单核细胞增生李斯特氏菌检验
GB 4789.4 食品安全国家标准 食品微生物检验沙门氏菌检验
GB 4789.13 食品安全国家标准 食品微生物学检验 产气荚膜梭菌检验
GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
GB 16548 病害动物和病害动物产品生物安全处理规程
GB 19489 实验室 生物安全通用要求
GB/T 27403 实验室质量安全控制规范 食品分子生物学检测
NY/T 541 动物疫病实验室检验采样方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 生物安全措施

工作人员应具备微生物相关资质，所有使用培养物和废弃物应按照GB 19489 中的有关规定执行。

5 原理

选择Tm值曲线为梯型（包括人字梯型、半人字梯型和直梯型）的特异性核酸片段为靶序列设计巢式引物，将巢式引物的外引物与内引物分别连接成一对引物作为等温扩增用引物，借助外引物与核酸靶序列上对应片段的熔解温度差异提供单链模板，在DNA聚合酶（大片段）催化下通过合成反应与链替代反应对梯型Tm值曲线的靶标核酸片段进行等温扩增，进行不同致病菌的定量分析技术。

6 试剂和材料

6.1 离心机；实时荧光定量 PCR 仪；培养箱；生物安全柜；核酸含量分析仪

DNA提取试剂盒；Tris-HCl；乙二胺四乙酸（EDTA）；异硫氰酸胍；Triton X-100。；异丙醇；TE溶液 (pH 8.0)；饱和酚；氯仿；异戊醇；TaqDNA聚合酶；BstDNA聚合酶；DEPC水、甜菜碱（Betain）、dNTPs、MgSO4、ThermoPolTM Reaction Buffer、SYBRGreenI荧光染料均；营养琼脂培养基、液体巯乙醇酸盐培养基（FTG）；TSB-YE 培养基；亚硒酸盐胱氨酸增菌液、亚硫酸铋琼脂。

6.2 致病菌特异性引物

6.2.1 产气荚膜梭菌

Cp-F3:5’-AGGCGGTGGTGGTGGATTTTGAGCT-GCTTCCATGAGAGCTAT-3’
Cp-B3:5’-CCTCCGCCGCCACTTTTTCCACAACA-GTTCTTTGTCGTG-3’
Cp-FIP:5’-CTCCGCCACCACCGCCGG-3’
Cp-LF:5’-GAGGAGGATCTTCTTCAC-3’

6.2.2 单核细胞增生李斯特菌

Lm-F3:5’-TGATGTTGGTGTTGCGTTTTGGGCA-ATTAACAGGCGATAACT-3’
Lm-B3:5’-CAGGAGGCGGCGGTTTTTCCAGTTG-TCCCTTCTCCACC-3’
Lm-LF:5’-CGATTTCTTGTTTAATGA-3’

6.2.3 沙门氏菌

Sa-F3:5’-GAACGTGTCGCGGAAGTC-3’
Sa-B3:5’-CGGCAATAGCGTCACCTT-3’
Sa-FIP:5’-CCGGCCTTCAAATCGGCAT-CAAGCCCGATTTTCTCTGGATGG-3’
Sa-LF:5’-GAACGGCGAAGCGTACTGGAC-ATCGCACCGTCAAAGGAA-3’

7 主要仪器和设备

7.1 移液器:量程 0.5 μL～10 μL; 量程 10 μL～100 μL; 量程 100 μL～1000 μL。
7.2 荧光定量PCR仪。
7.3 台式高速冷冻离心机：转速不低于 10000 r/min。

8 检测程序

畜禽产品中致病菌梯型熔解温度等温扩增检测程序见图 1。

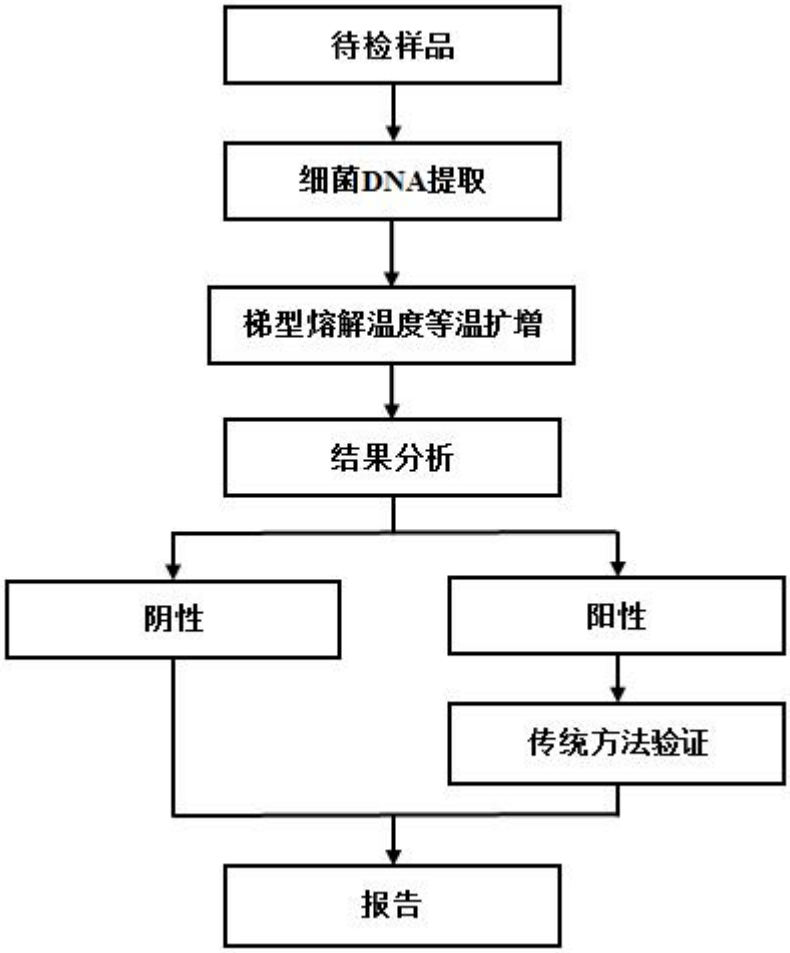

图 1 畜禽产品中致病菌梯型熔解温度等温扩增检测程序

8.1 样品制备

8.1.1 DNA提取

新鲜肉类、肉干和奶粉等固态样品：烘干、研磨成粉，称取50 mg，加200 μL TE溶液（pH 8.0），混匀，加400 μL裂解液[5 mol /L异硫氰酸胍，0.05 mol /L Tris-HC l (pH 6.4)，0.02 mol /L EDTA (pH 8. 0)，1.3 % Triton X-100]，涡旋混匀，加600 μL酚：氯仿：异戊醇 （25∶24∶1），剧烈振荡15 s, 13000 r /min离心10 min。取上清，加等体积氯仿：异戊醇 （24：1），剧烈振荡15 s，13000 r/min离心10 min。取上清，加等体积氯仿，剧烈振荡15 s，13000 r /min离心10 min。取上清，加0.6倍体积的异丙醇，13000 r /min离心10 min。取沉淀，70 %乙醇清洗1次，干燥，加100 μL TE溶液溶解即提取的总DNA。牛奶、鸡蛋等液态样品：取 200 μL液体，加400 μL裂解液，后面步骤同固态样品。

注：也可使用商品化的NucleoSpin® Food试剂盒提取样品中的总DNA。

8.2 梯型熔解温度等温扩增

8.2.1 梯型熔解温度等温扩增扩增体系

在200 μL PCR管中按表1依次加入反应试剂，混匀。放入荧光定量PCR仪中。

表1 梯型熔解温度等温扩增反应体系

试剂	作用浓度（10 μL）
Bst DNA Polymerase Buffer (10 ×)	1.0 μL
DNA模板	1.0 μL
引物F3	0.8 μM
引物B3	0.8 μM
引物LF/FIP	0.4μM
甜菜碱（betaine）	1.0 moL
dNTP	1.2 mmoL
MgSO4	4～6.0mmol
SYBR Green	1×
Bst DNA Polymerase（8U/ μL）	0.4 μL
水	至终体积 10 μL

8.2.2 梯型熔解温度等温扩增反应程序

反应程序为：55 ºC维持90s，共进行40次循环。在样品等温扩增的同时，应设置阴性对照、阳性对照和空白对照，实验重复三次。

9 致病菌检测结果判定

若荧光定量 PCR 仪中扩增结果图中出现指数曲线，则样品中含有引物所对应的致病菌；若扩增结果图中未出现指数曲线，则样品中不含有引物所对应的致病菌。

在样品梯型熔解温度等温扩增的同时，应设置梯型熔解温度等温扩增阴性对照、 梯型熔解温度等温扩增阳性对照和梯型熔解温度等温扩增空白对照，实验重复三次。

10 质量控制

以含有靶序列的质粒作为阳性对照，阳性对照的荧光强度应成指数增长。